

PENGGUNAAN MEDIA CAIR UNTUK MENGUJI KEPEKAAN KUMAN *MYCOPLASMA GALLISEPTICUM* ISOLAT LOKAL TERHADAP BEBERAPA ANTIBIOTIKA

M.B. POERWADIKARTA dan SOERIPTO
Balai Penelitian Veteriner

(Diterima untuk publikasi 31 Desember 1990)

ABSTRACT

Poerwadikarta M.B. and Soeripto, 1990. The use of mycoplasma broth medium for testing the sensitivity of *Mycoplasma gallisepticum* of local isolates against several antibiotics. *Penyakit Hewan* 22 (40): 80-85.

Treatment of chronic respiratory disease (CRD) caused by *Mycoplasma gallisepticum* (MG) continuously with the same antibiotic will induce resistance against MG. To determine the sensitivity of local MG isolates against several antibiotics was carried out using mycoplasma broth containing series concentration of antibiotic solutions. Determination of minimum inhibitory concentration (MIC) was done by looking at the changes of phenol red indicator of the control positive which occur on the first time whereas the final minimum inhibitory concentration (FMIC) was read on the 14th day of incubation. This test shows that all 14 local MG isolates tested were still sensitive against antibiotics used in this test and mycoplasma broth is a good medium for testing the sensitivity of MG. Tiamulin and enrofloxacin had shown to possess the highest antimycoplasma activity than other antibiotics. This study shows that enrofloxacin has a good potential for treating CRD in the field.

Key words: Mycoplasma broth, *Mycoplasma gallisepticum*, antibiotics.

ABSTRAK

Poerwadikarta M.B. dan Soeripto, 1990. Penggunaan media cair untuk menguji kepekaan kuman *Mycoplasma gallisepticum* isolat lokal terhadap beberapa antibiotika. *Penyakit Hewan* 22 (40): 80-85.

Pemakaian antibiotika yang terus menerus untuk pengobatan penyakit pernafasan menahun (PPM) yang disebabkan oleh *Mycoplasma gallisepticum* (MG) dapat menimbulkan resistensi MG terhadap antibiotika yang digunakan. Untuk mengetahui kepekaan kuman MG lokal terhadap beberapa antibiotika dilakukan pengujian kepekaan dengan menggunakan medium cair mikoplasma yang mengandung larutan antibiotika yang konsentrasinya berbeda-beda. Penentuan nilai kadar hambatan terkecil (KHT) dilakukan dengan melihat perubahan warna indikator merah fenol yang mula-mula terjadi pada kontrol positif, sedangkan kadar akhir hambatan terkecil (KAHT) dibaca pada hari ke 14 setelah inkubasi. Dari 14 kuman MG isolat lokal yang diuji menunjukkan bahwa semua kuman MG isolat lokal tadi masih peka terhadap antibiotika yang digunakan pada pengujian ini dan media cair mikoplasma adalah baik digunakan untuk menguji kepekaan isolat MG. Tiamulin dan enrofloxacin merupakan antibiotika yang paling sensitif dibanding antibiotika lainnya. Penelitian ini memperlihatkan bahwa enrofloxacin memiliki potensi yang tinggi untuk pengobatan PPM di lapangan.

Kata-kata kunci: Media cair mikoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, antibiotika.

PENDAHULUAN

Kuman *Mycoplasma gallisepticum* (MG) dikenal sebagai penyebab utama penyakit pernafasan yang disebut *chronic respiratory disease* (CRD) atau penyakit pernafasan menahun (PPM) pada ayam dan *infectious sinusitis* pada kalkun (Jordan, 1979; Yoder, 1984).

Penyakit ini dapat menimbulkan kerugian ekonomi yang mencapai jutaan dolar (Gilchrist, dikutip oleh Grimes, 1979; Carpenter dkk., 1981; Mohammed dkk., 1987). Kerugian ekonomi ini umumnya disebabkan oleh kendala produksi, baik produksi telur maupun daging yang turun. Menurut Soeripto (1989) PPM pada ayam potong dapat menyebabkan hambatan ke-

naikan berat badan sebesar 63,1 gr per ekor dan penurunan konversi pakan sebesar 0,3.

Kuman MG dilaporkan sensitive terhadap beberapa antibiotika seperti tiamulin, tylosin, kitasamycin, erythromycin, spiramycin, lincomycin dan spectinomycin (Whithear dkk., 1983). Sekalipun demikian, beberapa kuman MG dilaporkan resisten terhadap erythromycin dan streptomycin (Domermuth, 1960), dan terhadap tylosin dan erythromycin (Whithear dkk., 1983). Sejauh ini kepekaan dan resistensi kuman MG terhadap beberapa antibiotika belum pernah dilaporkan di Indonesia. Sedang pemakaian antibiotika untuk pencegahan dan pengobatan PPM pada ayam sudah banyak dipergunakan.

Penelitian ini bertujuan untuk mengetahui tingkat kepekaan dan resistensi isolat MG lokal terhadap beberapa antibiotika secara *in vitro* dengan menggunakan media cair mikoplasma.

BAHAN DAN CARA

Medium

Medium cair mikoplasma yang digunakan adalah modifikasi dari Frey dkk. (1968). Medium ini terdiri dari kaldu basa mikoplasma (GIBCO), sistein HCL (BDH), larutan merah fenol 1% (Chroma), talium astatat (BDH) yang dilarutkan dalam aquabidest. Setelah larut kemudian disterilkan pada suhu 121°C selama 15 menit. Setelah didinginkan pada temperatur kamar, medium tersebut kemudian ditambah dengan bahan penyubur yang terdiri dari serum babi 10% (diinaktivkan pada suhu 56°C selama 30 menit), ekstrak ragi 1% (Difco), DNA 0,002% (Koch-Light), larutan glukos 0,1% (May dan Baker) dan amoksisilin (Beecham P.I.). Yang masing-masing telah disterilkan dengan menggunakan filter Millipore 220 nm. Medium ini selain digunakan untuk pertumbuhan kuman juga digunakan sebagai pengenceran antibiotika yang akan diuji.

Isolat MG

Biakan murni kuman MG yang digunakan sebagai galur standar adalah S6 (ATCC 15302), KP18 (Jepang) dan X-95 (ATCC 19610), sedangkan isolat lokal yang digunakan sebanyak 14 isolat. Masing-masing kultur ini kemudian ditumbuhkan pada medium cair mikro-

plasma sebanyak 50 ml. Kultur tersebut kemudian di inkubasikan pada temperatur 37°C sampai indikator merah fenol berubah warna dari merah menjadi oranye agak kuning (pH 6.8). Kemudian kultur yang telah tumbuh dimasukkan ke dalam botol kecil-kecil yang masing-masing berisi 2 ml dan disimpan dalam temperatur -70°C untuk digunakan sebagai stok kultur.

Antibiotika

Antibiotika yang digunakan dalam pengujian kepekaan yaitu enrofloxacin, tiamulin hydrogen fumarate, erythromycin base, kitasamycin tartate, spiramycin adipate dan doxycycline.

Semua antibiotika yang dapat larut dalam air dilarutkan dalam aquabidest, sedangkan untuk antibiotika kelompok tetracyclin dan erythromycin masing-masing dilarutkan dengan larutan 0,01 M HCl dan larutan ethanol 7%. Masing-masing stok larutan antibiotika disaring dengan menggunakan filter membran 450 nm (Millipore) dan selanjutnya dibagi-bagi kedalam botol bijou secara aseptik dan disimpan pada temperatur -70°C sampai nanti digunakan. Larutan antibiotika yang akan dipergunakan dibuat pengenceran secara bertingkat dari 2,5 ug/ml sampai 0,00125 ug/ml, sedangkan untuk kitasamycin dan doxycyclin pengenceran dilakukan dari 5,0 ug/ml sampai 0,0025 ug/ml. Pengenceran larutan antibiotika dapat dilihat pada Tabel 1.

Pengujian kepekaan antibiotika

Metode Whithear dkk. (1983) digunakan untuk menguji kepekaan beberapa jenis antibiotika terhadap

Tabel 1. Pembuatan larutan antibiotika yang digunakan dalam uji kepekaan isolat MG lokal pada medium cair mikoplasma.

No. sumuran plate	Vol. antibiotika/ml.	Kadar antibiotika/ug.	Aquabidest (ml)	Perbandingan	Kadar penggunaan ug/ml	Kadar*) akhir ug/ml
1.	1	100	9	1 : 10	10	2,5
2.	5	10	5	1 : 2	5	1,25
3.	5	5	5	1 : 2	2,5	0,625
4.	5	2,5	5	1 : 2	1,25	0,3125
5.	5	1,25	5	1 : 2	0,625	0,156
6.	5	0,625	5	1 : 2	0,3125	0,078
7.	5	0,3125	5	1 : 2	0,156	0,039
8.	5	0,156	5	1 : 2	0,078	0,0195
9.	5	0,078	5	1 : 2	0,039	0,0098
10.	5	0,039	5	1 : 2	0,0195	0,0049
11.	5	0,0195	5	1 : 2	0,0098	0,0024
12.	5	0,0078	5	1 : 2	0,0049	0,0012

Keterangan: *) = Kadar akhir dalam medium cair mycoplasma

beberapa isolat MG lokal. MG galur standar juga diuji, dipakai sebagai bahan pembanding. Sembilan puluh enam sumuran plat mikrotiter dengan dasar U (Sterilin Ltd, Teddington, Middlesex, England) yang masing-masing sumuran telah diisi dengan kultur MG yang akan diuji kepekaannya sebanyak 150 ul dengan konsentrasi kuman sebesar 10^5 CCU/ml dari baris A sampai dengan baris F, ditambah dengan larutan antibiotika yang telah diencerkan secara bertingkat dari sumuran nomor 1 sampai dengan nomor 12. Konsentrasi antibiotika yang tertinggi dimasukkan pada sumuran nomor 1 sedangkan konsentrasi yang terendah dimasukkan dalam sumuran nomor 12. Untuk mengurangi kesalahan perhitungan maka tiap pengujian kepekaan satu isolat MG terhadap satu jenis antibiotika dilakukan 3 replikasi. Untuk 3 baris pertama dari A sampai dengan C masing-masing sumuran diisi dengan satu jenis antibiotika sebanyak 50 ul sedangkan 3 baris ke 2 dari D sampai F diisi dengan jenis antibiotika yang lain. Masing-masing sumuran pada baris G yang sudah diisi dengan kultur MG yang sama pada plat ini ditambah dengan media cair mikoplasma sebanyak 50 ul yang digunakan sebagai kontrol positif, sedangkan baris H masing-masing sumuran diisi dengan medium cair mikoplasma sebanyak 200 ul yang digunakan sebagai kontrol negatif. Selanjutnya plat ditutup dengan plastik polypropylene (Dynatech, Laboratories) atau plastik Lunch wrap (plastik berperekat) dan diinkubasikan pada temperatur 37°C sampai 14 hari. Pengamatan dilakukan setiap hari.

Parameter yang digunakan untuk menentukan peningkatan resistensi isolat MG lokal adalah apabila terlihat ada penurunan kepekaan sebesar 10 kali lipat atau lebih dari galur standar yang digunakan (Levi-sohn, 1981).

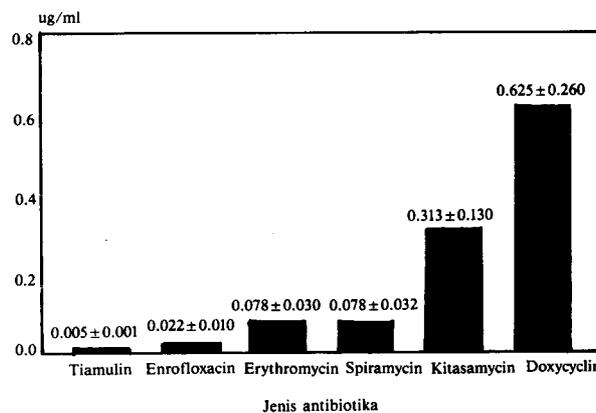
Pembacaan hasil

Hasil pengujian dibaca setelah terjadi perubahan warna indikator merah fenol 1% dari merah ke oranye atau kuning. Penentuan nilai kadar antibiotika yang terendah yang mampu mencegah terjadinya perubahan warna indikator, dinyatakan sebagai kadar hambatan terkecil (KHT) atau *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) dan ini ditentukan pada saat pertama terjadi perubahan warna indikator pada biakan kontrol positif. Kadar yang terendah pada medium yang dapat mencegah perubahan warna indikator pada hari ke 14 setelah inkubasi, dinyatakan sebagai kadar akhir hambatan terkecil (KAHT) atau *final minimum inhibitory*

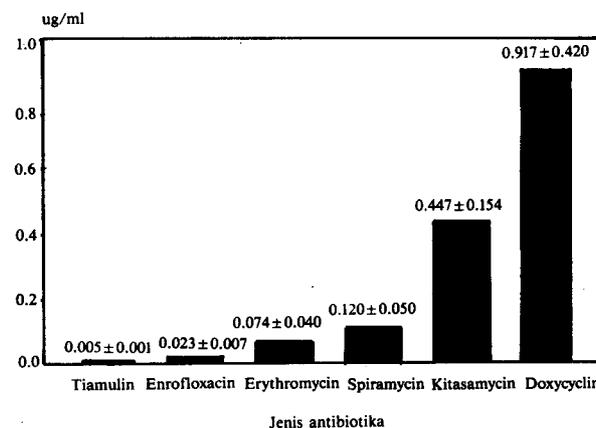
concentration (FMIC). Nilai KHT dan KAHT dinyatakan dalam ug/ml.

HASIL

Nilai KHT beberapa antibiotika terhadap kuman MG galur standar dapat dilihat pada Gambar 1, sedangkan terhadap isolat lokal dapat dilihat pada Gambar 2.



Gambar 1. Rata-rata KHT beberapa antibiotika terhadap MG galur standar



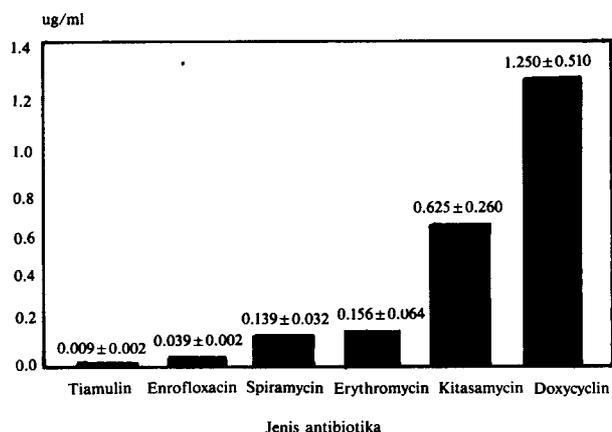
Gambar 2. Rata-rata KHT beberapa antibiotika terhadap isolat MG lokal

Dari hasil pengujian ini terlihat ada variasi kepekaan kuman MG terhadap beberapa antibiotika. Enrofloxacin memperlihatkan nilai KHT yang terendah setelah tiamulin sedangkan doxycyclin memperlihatkan nilai KHT yang tertinggi dibanding dengan antibiotika lainnya, baik untuk isolat lokal maupun untuk galur standar.

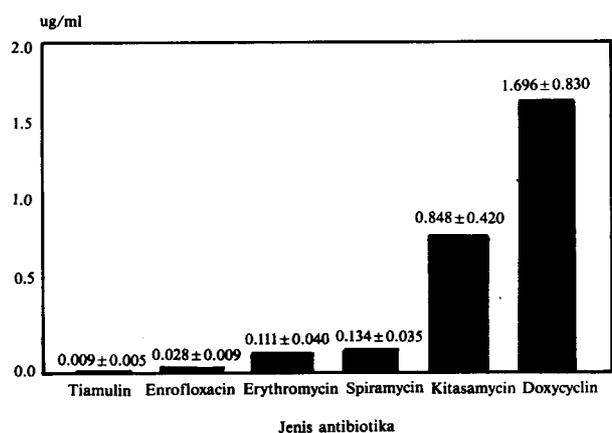
Nilai KHT enrofloxacin dan tiamulin terhadap isolat lokal tidak berbeda dengan nilai KHT terhadap

galur standar, tetapi nilai KHT antibiotika lainnya terhadap isolat lokal memperlihatkan lebih tinggi dari pada terhadap galur standar. Yang tertinggi terlihat pada doxycyclin dimana nilai KHT terhadap isolat lokal 1,5 kali lipat lebih tinggi dari pada terhadap galur standar.

Nilai KAHT beberapa antibiotika terhadap galur standar MG dapat dilihat pada Gambar 3, sedangkan terhadap isolat lokal dapat dilihat pada Gambar 4.



Gambar 3. Rata-rata KAHT beberapa antibiotika terhadap MG galur standar



Gambar 4. Rata-rata KAHT beberapa antibiotika terhadap isolat MG lokal

Semua nilai KAHT antibiotika baik untuk isolat lokal maupun untuk galur standar memperlihatkan nilai yang lebih besar dari pada nilai KHT antibiotika. Pada ke 2 gambar ini juga memperlihatkan bahwa nilai KAHT tiamulin dan enrofloxacin terendah dibanding dengan antibiotika lainnya, sedangkan doxycyclin memperlihatkan nilai KAHT yang tertinggi. Nilai KAHT enrofloxacin dan erythromycin terhadap isolat

lokal memperlihatkan lebih rendah dari pada terhadap galur standar, sedangkan nilai KAHT kitasamycin dan doxycyclin terhadap isolat lokal memperlihatkan lebih tinggi dari pada terhadap galur standar. Tiamulin dan spiramycin memperlihatkan nilai KAHT yang sama baik untuk isolat lokal maupun galur standar.

PEMBAHASAN

Beberapa cara uji kepekaan antibiotika *in vitro* terhadap kuman MG telah banyak diterapkan. Antara lain dengan tehnik difusi kertas diskus yang tidak banyak penggemarnya, karena kuman MG tumbuh lambat (Whithear, 1986); dengan media agar yang dipengaruhi oleh kelembaban, sayang biaya uji ini mahal sehingga peneliti tidak banyak tertarik (Kato dkk., 1972; Levisohn, 1981; Lin, 1987); dan penggunaan media cair (Whithear dkk., 1983). Uji terakhir ini banyak dipakai karena mudah dikerjakan dan mudah dikerjakan ulangan (reproducible), tetapi hanya dapat dipakai untuk kuman yang dapat memfermentasi glukose. Dalam penelitian disini, uji terakhir ini dipakai, karena kuman MG juga termasuk golongan kuman yang dapat memfermentasi glukose tadi.

Dari hasil penelitian terlihat bahwa tiamulin mempunyai aktivitas penghambat kuman MG yang paling tinggi. Hal ini sesuai dengan hasil Jordan dan Knight (1984). Namun demikian penerapan *in vivo* tiamulin bersama koksidiostat seperti monensin, salinomycin dan narasin menimbulkan keracunan pada unggas (Lin, 1987).

Enrofloxacin merupakan antibiotika baru yang termasuk kedalam kelompok derivat asam quinolone carboxylic yang memiliki sifat bakterisidal pada konsentrasi yang rendah (Altreuther, 1987). Pada pengujian ini kepekaan kuman MG baik pada isolat lokal maupun galur standar menunjukkan 0.022 ug/ml. Hasil ini sesuai dengan pendapat Scheer (1987) yang melaporkan variasi nilai KHT enrofloxacin untuk mikoplasma antara 0.01 dan 0,1 ug/ml.

Erythromycin merupakan antibiotika yang termasuk kedalam kelompok makrolid. Antibiotika ini banyak digunakan sebagai kontrol penyakit bakteri pada unggas terutama mikoplasma karena memiliki aktivitas antimikoplasma yang relatif cukup tinggi (Lin, 1987). Kepekaan isolat lokal terhadap erythromycin tidak berbeda dengan kepekaan terhadap galur standar. Hal ini bertentangan dengan apa yang dilaporkan oleh Lin (1987) yang menyatakan bahwa isolat lokal MG dari Taiwan sudah resisten terhadap anti-

biotika ini. Hal ini mungkin terjadi karena erythromycin di Taiwan banyak digunakan untuk pengobatan PPM sehingga timbul resistensi terhadap antibiotika tersebut.

Kepekaan isolat lokal MG terhadap spiramycin dan kitasamycin menunjukkan sedikit lebih rendah dari pada galur standar. Akan tetapi karena perbedaan nilai tersebut tidak melebihi 10 kali lipat maka hal ini tidak menunjukkan indikasi resisten terhadap kedua antibiotika tersebut (Levisohn, 1981).

Doxycyclin merupakan antibiotika yang termasuk dalam kelompok tetracyclin. Antibiotika ini juga dilaporkan banyak digunakan dilapangan untuk pengobatan PPM karena memiliki aktivitas antimikoplasma yang cukup tinggi (Kleven dan Anderson, 1971). Pada pengujian ini nilai KHT doxycyclin selain lebih tinggi dari pada antibiotika lainnya juga nilai KHT untuk isolat lokal lebih tinggi dari pada galur standar. Sekalipun demikian karena kenaikannya tidak melebihi dari 10 kali lipat seperti dikatakan oleh Levisohn (1981) maka kemungkinannya antibiotika ini belum memperlihatkan ada perkembangan resistensi. Hasil ini berbeda dengan apa yang dilaporkan oleh Lin (1987) yang menyatakan bahwa isolat lokal MG yang ditelitinya sudah resisten terhadap antibiotika ini.

Pada pengujian ini secara umum nilai KAHT terlihat lebih tinggi dari pada nilai KHT. Hal ini menunjukkan ada pengaruh waktu inkubasi terhadap aktivitas antimikoplasma dan aktivitas metabolik pada mikoplasma seperti apa yang telah diuraikan oleh Whithear dkk. (1983), bahwa Isolat MG merupakan salah satu kuman yang memiliki aktivitas metabolik sangat rendah dengan pertumbuhan yang lambat.

Penggunaan media cair untuk menguji kepekaan isolat MG dengan 3 ulangan tidak memperlihatkan hasil variasi yang tinggi baik pada KHT maupun KAHT. Hal ini sejalan dengan pendapat Whithear dkk. (1983) yang mengatakan bahwa media cair dapat digunakan dengan baik untuk menguji kepekaan isolat MG dan dapat dikerjakan ulang.

Kesimpulan dari percobaan ini menunjukkan bahwa media cair mikoplasma adalah baik digunakan untuk menguji kepekaan isolat MG dan pada umumnya isolat lokal MG masih sensitif terhadap 6 antibiotika yang digunakan pada pengujian ini. Tiamulin dan enrofloxacin memperlihatkan nilai KHT yang tertinggi dibanding antibiotika lainnya.

DAFTAR PUSTAKA

- ALTREUTHER P. 1987. Data on chemistry and toxicology of Baytril. *Vet. Med. Rev.* 2: 87-89.
- CARPENTER T.E., MALLINSON E.T., GENTRY R.F. and SCHWARTZ, L.D. 1981. Vaccination with F strain *M. gallisepticum* to reduce production losses in layer chickens. *Avian Dis.* 25: 404-409.
- DOMERMUTH C. H. 1960 Antibiotic resistance and mutation rates of mycoplasma. *Avian Dis.* 4: 456-466.
- FREY M. L., R. P. HANSON and D. P. ANDERSON. 1968. A medium for the isolation of avian Mycoplasma. *Am. J. Vet. Res.* 29: 2164-2171.
- GRIMES, T.M. 1979. Major health problems facing the Australian poultry industry. *Aust. Poultry. Conf. Terrigal.* Nov. pp. 118-134.
- HANNAN. P.C.T., O'HANLON P.J. and ROGERS N.H. 1989. In vitro evaluation of various quinolone antibacterial agents against veterinary mycoplasmas and porcine respiratory bacterial pathogens. *Res. Vet. Sci.* 46: 20-21.
- JORDAN, F.T.W. 1979. *Avian Mycoplasmas*. In: *The Mycoplasmas II. Human and Animal Mycoplasmas*. J.G. Tully and R.F. Whitcomb., eds. Acad. Press, New York, San Fransisco, London. pp. 1-48.
- JORDAN F. T. W. and DARYL KNIGHT. 1984. The Minimum Inhibitory Concentration of Kitasamycin, Tylosin and Tiamulin for *Mycoplasma gallisepticum* and Their Protective effect on infected chicks. *Avian Pathology* 13: 151-162.
- KATO H., T. MURAKAMI, S. TAKASE and K. ONO. 1972. Sensitivity in vitro to antibiotics of Mycoplasma isolated from canine sources. *Jap. J. Vet. Sci.*, 34: 197-206.
- KLEVEN S.H. and D.P. ANDERSON. 1971. In vitro activity of various antibiotics against *Mycoplasma sinoviae*. *Avia Dis.* 15: 551-557.
- LEVISOHN S. 1981. Antibiotics sensitivity patterns in field isolates of *Mycoplasma gallisepticum* as a guide to chemotherapy. *Isr. J. Med. Sci.* 17: 661-666.
- LIN M. Y. 1987. In-vitro comparison of the activity of various antibiotics and drugs against new Taiwan isolates and standard strains of avian mycoplasma. *Avian Dis.* 31: 705-712.
- MEYNELL G. G. and MEYNOL E. 1975. *Theory and Practice in Experimental Bacteriology*. Cambridge University Press, London, New York, Melbourne, p.231.
- MOHAMMAD H. O., CARPENTER T. E. and YAMAMOTO R. 1987. Economic impact of *M. gallisepticum* and *M. synoviae* in commercial layer flocks, *Avian Dis.* 31: 477-482.
- SCHEER M. 1987. Studies on antibacterial activity of Baytril. *Vet. Med. Rev.* 2: 90-99.
- SOERIPTO. 1989. Pengaruh suanovil terhadap kenaikan bobot berat badan ayam pedaging yang terserang chronic respiratory disease (CRD). *Penyakit Hewan*, 38: 102-106).
- WHITHEAR K. G. 1986. Mycoplasmosis. *Proc. Aust. Vet. Assoc.* 92: 397-415.

WHITHEAR K. G., D. D. BOWTELL, E. GHIOCAS and K. L. HUGHES.
1983. Evaluation an use of Micro-broth Dilution Procedure
for testing sensitivity of fermentative avian Mycoplasma to anti-
biotics. *Avian Dis.* 4: 937-949.

YODER, W.Jr. 1984. *Mycoplasma gallisepticum* infection. *In:*
Diseases of Poultry. 8th ed. M.S. Hofstad, B.W. Calnek, C.F.
Helmholtz, W.N. Reid and H.W. Yoder Jr., eds. Iowa State
Univ. Press, Ames, Iowa. pp. 202-211.